



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>G01N 33/564, 33/50</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 98/11439</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 19 mars 1998 (19.03.98)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/01620 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 12 septembre 1997 (12.09.97)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/11347 12 septembre 1996 (12.09.96) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> MALCUS- VOCANSON, Carine [FR/FR]; 9, rue des Ronzières, F-69530 Brignais (FR). PERRON, Hervé [FR/FR]; 134, rue du Docteur Edmond Locard, F-69005 Lyon (FR). MANDRAND, Bernard [FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR).  <b>(74) Mandataire:</b> CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR DETECTING AND/OR QUANTIFYING A GLIOTOXIC FACTOR <b>(54) Titre:</b> PROCEDE DE DETECTION ET/OU DE QUANTIFICATION D'UN FACTEUR GLIOTOXIQUE  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention proposes a method for detecting and/or quantifying, in a biological sample a cytotoxic factor, in particular a gliotoxic factor, with respect to adherent target cells, in particular macroglial cells, the toxicity of which causes the death by apoptosis of said cells. The method consists in providing an initial fraction of said sample, optionally enriched with said toxic factor by previous treatment, incubating said initial toxic factor with a reference culture medium comprising adherent target cells, and detecting and/or quantifying the adherent target cells killed by apoptosis, by flux cytometry, at least one direct or indirect characteristic associated with the apoptotic adherent cells of the whole or part of the incubated medium, which, if it is present and/or is quantified, qualifies the sample as positive, i.e. as containing said toxic factor. The initial biological sample is preferably a urine specimen.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention propose un procédé pour détecter et/ou quantifier, dans un échantillon biologique, un facteur cytotoxique, notamment un facteur gliotoxique, vis-à-vis de cellules adhérentes cibles, notamment les cellules macrogliales, et dont la cytotoxicité induit la mort par apoptose desdites cellules, selon lequel on dispose d'une fraction de départ dudit échantillon, éventuellement enrichie en ledit facteur toxique par un traitement préalable, on incube ladite fraction de départ avec un milieu de culture de référence comprenant des cellules adhérentes cibles, et on détecte et/ou quantifie les cellules adhérentes mortes par apoptose, par cytométrie de flux, au moins une caractéristique directe ou indirecte, associée aux cellules adhérentes apoptotiques de tout ou partie du milieu incubé, qui, si elle existe et/ou est quantifiée, qualifie ledit échantillon biologique comme positif, c'est-à-dire contenant ledit facteur toxique. L'échantillon biologique de départ est de préférence un échantillon d'urine.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Belarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NI	Niagara	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## PROCÉDE DE DETECTION ET/OU DE QUANTIFICATION D'UN FACTEUR GLIOTOXIQUE

La présente invention concerne la détermination, la détection, et la quantification dans un échantillon  
5 biologique d'un facteur gliotoxique, tel qu'associé à la sclérose en plaques.

Par "échantillon biologique", on entend notamment un prélèvement du type fluide biologique, un tissu vivant ou fragment de tissu, une mucosité, un organe ou fragment  
10 d'organes, ou tout surnageant de culture obtenu à l'aide d'un prélèvement précité.

Conformément au document WO-A-95/21859, demande déposée au nom de la Demanderesse, on a isolé et/ou caractérisé un facteur cytotoxique vis-à-vis des cellules  
15 gliales (astrocytes, oligodendrocytes, microgliocytes), dénommé ci-après facteur gliotoxique. Ce dernier est en particulier associé à la sclérose en plaques, mais pourrait être également associé à d'autres maladies neurodégénératives ou auto-immunes.

A défaut d'un séquençage complet de ce facteur  
20 gliotoxique, celui-ci peut être caractérisé, soit à partir d'un procédé (parmi d'autres) permettant de l'isoler ou le purifier, soit à partir de différentes propriétés ou caractères biologiques, biochimiques ou chimiques.

Selon le document WO-A-95/21859, ce facteur  
25 gliotoxique est caractérisé par l'ensemble des propriétés ci-après, considérées séparément ou en combinaison :

- il possède une activité toxique vis-à-vis des cellules astrocytaires humaines ou animales, ayant pour  
30 effet une désorganisation cytomorphologique de leur réseau de filaments intermédiaires, et/ou une dégradation des protéines de ces filaments intermédiaires et/ou une mort cellulaire notamment par apoptose,

- son activité est associée à au moins une  
35 glycoprotéine,

- ce facteur gliotoxique est constitué

**COPIE DE CONFIRMATION**

majoritairement, sinon en totalité, par une fraction légère, centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 17 kD ; cette fraction légère est résistante dans des conditions standard non dénaturantes, à l'action  
5 hydrolytique de la pronase, ou de la trypsine, ou de la protéinase K ; et cette même fraction légère présente un forte affinité pour les lectines et notamment la concanavalline-A.

Dès lors, la détection et/ou quantification de ce  
10 facteur gliotoxique, dans tout échantillon biologique est un outil intéressant et effectif d'analyse, notamment pour le diagnostic de différentes pathologies, dont la sclérose en plaques, la prédiction, le suivi et la thérapeutique de cette maladie. Toujours selon le document WO-A-95/21859,  
15 dont le contenu et la description sont incorporés à la présente demande de brevet par référence, on a décrit et proposé un procédé pour détecter et/ou quantifier dans un échantillon biologique, par exemple un échantillon de liquide céphalo-rachidien (LCR), ce facteur gliotoxique.  
20 Un tel procédé comprend au moins les traitements suivants :

- on dispose d'une fraction de départ de cet échantillon, éventuellement enrichie en ledit facteur gliotoxique par tout traitement préalable approprié,
- 25 - on incube cette fraction de départ avec un milieu de culture de référence, comprenant par exemple des cellules gliales, notamment immortalisées, par exemple des cellules astrocytaires, et
- on détecte et/ou quantifie les cellules gliales  
30 mortes ou vivantes, selon toute technique appropriée, par exemple avec un dosage colorimétrique mettant en oeuvre respectivement la calcéine-AM et l'éthidium homodimère.

Un tel procédé, mis en oeuvre pour la détection et le suivi thérapeutique de la sclérose en plaques  
35 suppose un prélèvement dit "invasif", par exemple de LCR, c'est-à-dire requérant un acte préalable médical ou

chirurgical.

On a à présent découvert que l'urine s'avère être un fluide biologique particulièrement favorable à la détection de l'activité gliotoxique. Cette découverte  
5 était tout à fait surprenante du fait de la composition complexe de l'urine, de son caractère acide, de la présence d'urée qui, a priori, selon les connaissances générales de l'homme du métier, n'étaient pas compatibles avec la détection d'une telle activité cellulaire.

10 C'est donc de manière totalement inattendue, sur la base de cette découverte, que les inventeurs ont mis au point un procédé de détermination du facteur gliotoxique dans l'urine, qui présente, en outre, l'avantage d'utiliser un prélèvement non invasif, au même titre que  
15 tout autre échantillon obtenu de manière "invasive", par exemple un échantillon de LCR, pour la détection et/ou la quantification du dit facteur chez un patient.

Ainsi un premier objet de l'invention est un procédé pour détecter et/ou quantifier, dans un  
20 échantillon biologique, un facteur gliotoxique, selon lequel on dispose d'une fraction de départ dudit échantillon, éventuellement enrichie en ledit facteur gliotoxique par un traitement préalable, on incube ladite fraction de départ avec un milieu de culture de référence  
25 comprenant des cellules macrogliales, par exemple immortalisées, telles que des cellules astrocytaires, et on détecte et/ou quantifie les cellules macrogliales mortes et/ou vivantes, ledit échantillon biologique étant un échantillon d'urine.

30 On a ensuite défini un procédé de détection et/ou quantification comprenant une étape de détection et/ou quantification spécifiquement des cellules mortes par l'apoptose induite par le facteur gliotoxique.

Selon le document EP-A-0 731 179, on connaît un  
35 procédé de détection de lymphocytes préapoptotiques par la cytométrie de flux, après marquage de l'ADN

intracellulaire desdits lymphocytes. Ce document illustre l'utilisation de la cytométrie de flux pour la détection de cellules à l'état préapoptotique non adhérentes, c'est-à-dire en suspension.

5 Il n'en va pas de même des techniques de détection de l'apoptose sur des cellules adhérentes. Telles que pratiquées aujourd'hui, et en raison de la fragilité des cellules adhérentes apoptotiques, ces techniques reposent sur une observation visuelle de  
10 l'apoptose in situ, par microscopie, avec un comptage des cellules apoptotiques. A titre d'exemple, on peut citer l'article de R.W. Keane, A. Srinivasan, L.M. Foster et al., J. Neurosci. Res., 1997, 71, 1992-2003, concernant la  
15 détection de cellules adhérentes apoptotiques du système nerveux.

Il s'avérerait donc nécessaire de disposer d'un procédé qui pallie les inconvénients précités des techniques couramment utilisées pour la détection de  
20 cellules apoptotiques, c'est-à-dire un procédé notamment simple et peu coûteux, et qui de plus permette de prendre en compte les contraintes liées à la fragilité des cellules apoptotiques.

Aussi, selon l'invention, on fournit un procédé pour détecter et/ou quantifier, dans un échantillon  
25 biologique, un facteur cytotoxique vis-à-vis de cellules adhérentes cibles et dont la cytotoxicité induit la mort par apoptose desdites cellules, selon lequel on dispose d'une fraction de départ dudit échantillon, éventuellement enrichie en ledit facteur toxique par un traitement  
30 préalable, on incube ladite fraction de départ avec un milieu de culture de référence comprenant des cellules adhérentes cibles, et on détecte et/ou quantifie les cellules adhérentes mortes par apoptose, par cytométrie de flux, au moins une caractéristique directe ou indirecte,  
35 associée aux cellules adhérentes apoptotiques de tout ou partie du milieu incubé, qui, si elle existe et/ou est

quantifiée, qualifie ledit échantillon biologique comme positif, c'est-à-dire contenant ledit facteur toxique.

Le procédé défini ci-dessus est avantageusement appliqué à la détection du facteur gliotoxique et les  
5 cellules adhérentes cibles sont les cellules macrogliales, notamment des cellules astrocytaires.

Ainsi selon au moins l'une des caractéristiques précitées, on apporte :

- un procédé pouvant comprendre un prélèvement  
10 "non invasif",

- un procédé simple de mise en oeuvre, sensible, spécifique, du facteur gliotoxique.

On sait que l'apoptose des cellules macrogliales est caractérisée notamment par :

15 \* une fragmentation de l'ADN cellulaire des cellules apoptotiques ;

\* la conservation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique des cellules apoptotiques ;

\* des modifications structurales et de taille des  
20 cellules apoptotiques.

Grâce au procédé de l'invention, on peut ainsi déterminer :

\* la ploïdie des cellules macrogliales, c'est à dire la détermination de la quantité d'ADN restant dans  
25 les cellules après extraction des fragments d'ADN, étant entendu que dans des cellules non apoptotiques la quantité d'ADN est conservée puisqu'il n'y a pas de fragmentation ; à partir de la ploïdie, on peut également étudier le cycle cellulaire ;

30 \* l'état des cellules macrogliales ; ainsi, la morphologie cellulaire est déterminée par la taille des cellules, par exemple selon la technique dite FALS ("Forward Light Angle Scatter"), la mort par apoptose des astrocytes entraînant une diminution de leur taille ; par  
35 la structure desdites cellules, par exemple selon la technique dite SS ("Side Scatter") ; et éventuellement par

la présence et/ou quantité d'une protéine permettant de discriminer les sous-populations cellulaires, telle que la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), par exemple avec un anticorps marqué anti-GFAP identifiable directement ou  
5 indirectement.

Aux fins de la détection et/ou quantification des cellules macrogliales mortes par apoptose spécifiquement, par cytométrie de flux, ledit procédé de l'invention comprend au moins un des protocoles (1) à (3) suivants ;  
10 avantageusement les protocoles (1) et (2) ou (1) et (3) sont employés en combinaison.

Protocole 1)

- décollement des cellules macrogliales adhérentes,
- 15 - traitement des cellules ainsi décollées par un agent de fixation cellulaire et de perméabilisation de la membrane cytoplasmique desdites cellules,
- extraction de fragments d'ADN intracellulaire résultant de l'apoptose,
- 20 - marquage de l'ADN cellulaire restant, par un marqueur approprié, et
- détection par cytométrie de flux de la ploïdie des cellules macrogliales.

Avantageusement, l'agent de fixation cellulaire  
25 et de perméabilisation de la membrane cytoplasmique des cellules est l'éthanol et le marqueur de l'ADN est l'iodure de propidium (IP).

Protocole (2)

- induction d'une nécrose sur un échantillon  
30 de cellules macrogliales vivantes, différent de l'échantillon à analyser, notamment par incubation,
- marquage des débris d'ADN résultant de la nécrose, lesdits débris étant associés à des fragments de la membrane cytoplasmique des cellules macrogliales  
35 nécrotiques, le marquage étant effectué après décollement desdites cellules,



- localisation en cytométrie de flux, des cellules mortes par nécrose, et réglage approprié du cytomètre permettant lors de l'étape de détection des cellules mortes par apoptose, d'exclure les cellules  
5 mortes par nécrose,

- détection des cellules mortes par apoptose.

Protocole (3)

- partage des cellules de l'échantillon biologique en deux parties égales, et décollement des  
10 cellules,

- détection, par cytométrie de flux, dans une des deux parties, des cellules macrogliales mortes par apoptose ou par nécrose, d'une part, et/ou des cellules macrogliales vivantes, d'autre part, étape selon laquelle  
15 on traite ladite fraction avec un agent de fixation cellulaire et de perméabilisation de la membrane cytoplasmique ; on extrait les fragments d'ADN ; on marque à l'aide d'un marqueur de l'ADN intracellulaire, et on détecte l'ADN intracellulaire restant,

20 - détection, par cytométrie de flux après fixation sans extraction, dans l'autre des deux parties, des cellules macrogliales vivantes et des cellules macrogliales apoptotiques, d'une part, et/ou des cellules macrogliales nécrotiques, d'autre part,

25 - déduction des détections effectuées sur chacune des deux parties, de la quantité de cellules macrogliales apoptotiques.

Selon le protocole (2) ou (3) défini ci-dessus, il est possible de distinguer les cellules apoptotiques de  
30 cellules nécrotiques. On sait que les phénomènes de nécrose se matérialisent par un éclatement de la paroi cellulaire et le relargage des constituants de la cellule. Les cellules nécrotiques se distinguent donc des autres cellules, vivantes ou apoptotiques, en ce que l'intégrité  
35 de leur membrane cytoplasmique n'est pas conservée. Ceci peut être mis en évidence soit à partir d'une expérience

isolée après induction de la nécrose sur des cellules macrogliales vivantes afin de localiser les cellules nécrotiques obtenues et de réaliser le réglage approprié du cytomètre de façon à pouvoir, dans la détermination  
5 finale des cellules apoptotiques, exclure ces cellules nécrotiques (protocole 2) ; soit par une étude parallèle sur deux sous-populations identiques issues de mêmes cellules macrogliales après induction potentielle de l'apoptose sur ces cellules, lesdites cellules étant  
10 traitées de deux façons distinctes : à savoir, d'une part, après fixation à l'éthanol et extraction des fragments d'ADN, le marquage à l'IP permet de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes (nécrose et apoptose) ; d'autre part, après fixation sans extraction  
15 des fragments d'ADN, le marquage à l'IP permet ainsi de distinguer les cellules nécrotiques des cellules vivantes ou apoptotiques (puisque, en l'absence d'extraction, les fragments d'ADN sont conservés à l'intérieur des cellules apoptotiques) ; et ensuite, par déduction, on peut  
20 déterminer la proportion de chaque sous-catégorie cellulaire, donc la proportion de cellules apoptotiques (protocole 3).

Cette distinction entre cellules nécrotiques et apoptotiques est nécessaire notamment dans le cas  
25 d'interférences médicamenteuses chez des patients, lesdites substances pouvant induire des phénomènes de recouvrement de la population des cellules nécrotiques et de la population des cellules apoptotiques, matérialisés en particulier par la génération de résultats faussement  
30 positifs au test de détection d'apoptose. Cette interférence a en effet été observée à partir d'échantillons biologiques, par exemple des urines, issus de patients ayant subi un traitement par des substances médicamenteuses interférentes, par exemple le méthotrexate  
35 ou le dextropropoxyphène.

L'application du procédé de l'invention pour

détecter et/ou quantifier spécifiquement des cellules macrogliales apoptotiques, à un échantillon d'urine, permet d'obtenir un bio-essai particulièrement simple, sensible et spécifique du facteur gliotoxique, par exemple  
5 en ce qui concerne l'aide au diagnostic de la sclérose en plaques, qui aujourd'hui requiert beaucoup d'essais ou examens différents sur une période de temps qui peut être relativement longue.

Selon une mise en oeuvre particulière du procédé  
10 de l'invention, celui-ci peut comprendre, avant l'étape de détection et/ou quantification des cellules macrogliales apoptotiques, une étape de détection de la viabilité cellulaire. A cet effet, on inocule la fraction de départ dans le milieu de culture de référence, puis on observe le  
15 taux de prolifération des cellules macrogliales par rapport à une valeur de référence, en deçà de laquelle ladite fraction dite positive est retenue pour être soumise ensuite à l'étape de détection de l'apoptose des cellules macrogliales spécifiquement, pour qualifier ou  
20 non l'échantillon biologique comme vrai positif.

Au cours de cette étape de détection de la viabilité cellulaire, le taux de prolifération des cellules macrogliales peut être obtenu par coloration mitochondriale des cellules macrogliales du milieu de  
25 culture, par exemple par du bromure de méthyltétrazolium, puis par mesure de la densité optique du milieu de culture coloré. A titre d'exemple on peut citer le dosage colorimétrique au méthyl-tétrazolium des cellules vivantes (MTT), tel que décrit dans le document WO-A-95/21859.

30 Pendant l'étape de détection de l'apoptose des cellules macrogliales spécifiquement, on peut avantageusement pratiquer, en outre, une détermination de la présence et/ou quantité d'une protéine permettant de discriminer les sous-populations cellulaires, telle que la  
35 protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), par exemple avec un anticorps anti-GFAP identifiable directement ou

indirectement.

Une détermination des changements intervenant au niveau des phospholipides de la membrane cytoplasmique des cellules apoptotiques, sans affecter son intégrité, et mis  
5 en évidence par l'annexine V peut aussi être prévue pour compléter le procédé de l'invention..

La fraction de départ de l'échantillon biologique dans lequel on détecte et/ou quantifie le facteur gliotoxique peut être obtenue par enrichissement ou  
10 purification de l'échantillon biologique en facteur gliotoxique. Cet enrichissement ou purification est notamment réalisé par au moins l'un des traitements suivants, à savoir précipitation de la fraction protéique, par exemple avec du sulfate d'ammonium, chromatographie  
15 par exclusion et/ou ionique, électrophorèse à une ou deux dimensions, mise en contact avec la protéine A ou une lectine, par exemple la concanavaline-A.

Le milieu de culture de référence dans lequel ladite fraction de départ est incubée comprend de  
20 préférence une lignée cellulaire immortalisée de cellules macrogliales, par exemple une lignée cellulaire immortalisée d'astrocytes.

Les cellules macrogliales considérées selon la présente invention comprennent notamment les astrocytes et  
25 les oligodendrocytes.

La présente invention est maintenant décrite par référence aux exemples 1 à 7 suivants et au dessin dans lequel :

- la figure 1 (A à G) représente les histogrammes  
30 obtenus par cytométrie de flux pour un échantillon contenant seulement quelques cellules nécrotiques mais ne contenant pas de cellules apoptotiques,

- la figure 2 (A à G) représente les histogrammes obtenus par cytométrie de flux pour un échantillon  
35 contenant des cellules apoptotiques.

Les lettres A à L apparaissant sur les

histogrammes correspondent à la localisation des cellules visualisées en cytométrie de flux.

Exemple 1 : Etape de détection de l'apoptose, par  
5 cytométrie de flux.

La lignée d'astrocytes immortalisés est obtenue conformément à l'article de E. Galiana, I. Borde, P. Marin, M. Rassoulzadegan, F. Chuzin, F. Gros, P. Rouget et C. Evrard, Establishment of permanent astroglial cell  
10 lines, able to differentiate in vitro, from transgenic mice carrying the polyoma virus large-T gene : an alternative approach to brain cell immortalization, Journal of Neuroscience Research, 1990 ; 26 ; 269-277, article dont le contenu est incorporé par référence à la  
15 présente description.

Le milieu dénommé milieu M est constitué comme suit : DMEM (400 µl/200 ml) / F12 (1/1) + 10% FCS non décomplémenté + Pénicilline/Streptomycine (antibiotique) + Fungizone (antifongique) (20 µl/40 ml).

20 Le cytomètre utilisé est un cytomètre Epics XL Coulter (de la société Coultronics France). Le réglage du programme utilisé est le suivant :

débit : 60 µl/min

gaine liquide : IsoFlow (nom commercial)

25 fluorescence :

	tension (V)	gain
FL1 (FITC)	605	1
FL3 (IP)	715	2
30 AUX (FL3)	190	1
FS	423	1
SS	800	1

FL : fluorescence ; FITC : isothiocyanate de  
35 fluorescéine ; IP : iodure d propidium ; AUX : canal

auxiliaire permettant un double réglage sur l'iodure de propidium ; FS : diffraction ; SS : réfraction à 90°.

Protocole expérimental :

5 On prépare à l'avance des boîtes 24 ou 48 puits revêtues de poly L-Lysine à 12,5 µg/ml :

En atmosphère stérile (flux laminaire), on effectue les manipulations suivantes :

diluer les tubes de 4 ml de poly-L-Lysine  
10 (congelé -20°C) au 1/10ème dans H<sub>2</sub>O distillée,

ajouter 250 µl/puits de cette solution,

laisser incuber 2 heures au moins,

aspirer,

rincer avec 500 µl/puits H<sub>2</sub>O distillée (24 puits)

15 ou 250 µl/puits (48 puits),

aspirer,

laisser sécher les boîtes ouvertes sous le flux  
(de quelques min à 30 min),

les refermer et les stocker sous le flux.

20 Premier jour :

Les cellules contenues dans une boîte 250 cm<sup>2</sup> sont trypsinées (solution préparée à partir d'une solution de trypsine 1/250e (S1 : 45 ml) et d'une solution 1% EDTA (S2 : 5 ml) et conservée à +4°C) :

25 La boîte est sortie de l'étuve. Le milieu qui recouvre les cellules est aspiré (pipette de 10 ml) et éliminé. Les cellules adhérentes sont rincées avec 10 à 15 ml de DMEM/F12 (1/1) qui sont aspirés. On additionne 1 à 1,2 ml de trypsine/EDTA, les cellules sont remises dans  
30 l'étuve pendant 10 min. Elles sont décollées de leur support mécaniquement à l'aide d'une pipette de 10 ml de milieu M. Après homogénéisation elles sont lavées dans 20 ml de DMEM/F12 supplémentaires puis centrifugées 10 min à 1500 tours/min (18°C).

35 Le surnageant est éliminé avec précaution. Les cellules sont reprises par 2 ml de DMEM/F12 et

homogénéisées longuement. Elles sont à nouveau lavées dans 25 ml de DMEM/F12 puis centrifugées (10 min, 1500 tours/min, 18°C). Le surnageant est éliminé. Les cellules sont reprises par 2 ml du milieu et homogénéisées longuement afin d'obtenir une suspension la plus uniforme possible. 1 à 5 ml du milieu sont additionnés en fonction de l'importance du culot.

Les cellules sont numérotées directement dans une cellule de Tomas. La concentration cellulaire est ajustée à 10 000 cellules/ml par dilution dans le milieu M afin de déposer 20 000 cellules/puits, soit 2 ml/puits pour une plaque à 6 puits. A titre d'exemple pour 8 plaques 6 puits, on a besoin de 8 x 6 x 2 ml de suspension soit 96 ml ; on prépare 120 ml (3 x 40 ml) de suspension ; il reste ainsi environ 25 ml de suspension qui serviront à remettre les cellules restantes en culture, en les ajoutant dans ces 25 ml restant.

Les plaques ainsi préparées sont recouvertes de film protecteur pour éviter l'évaporation.

20 Deuxième jour :

Le facteur gliotoxique est ajouté dans chaque puits à raison de 60 à 80 µl/puits suivant la quantité présumée de facteur toxique dans l'échantillon (10 µl/puits pour les urines, 10 à 50 µl/puits pour les fractions purifiées et les autres échantillons).

La boîte est sortie de l'étuve. Le film protecteur est enlevé. Le facteur est ajouté en triplicat dans 2 ou 3 puits successifs. Un nouveau film protecteur est mis en place. Les plaques sont remises à l'étuve (37°C CO<sub>2</sub> 5% H<sub>2</sub>O 95%) pendant 72 heures.

Cinquième jour :

L'état des cellules vivantes présentes dans les puits est évalué par cytométrie de flux après marquage à l'iodure de propidium pour mettre en évidence les cellules apoptotiques.

Les boîtes sont sorties de l'étuve. Le film

protecteur est ôté. Le milieu est aspiré (pipettes pasteur droites non cotonnées) en prenant soin de ne pas aspirer les cellules adhérentes au fond des puits. Les cellules sont rincées avec 2 ml de PBS.

5 Les cellules sont ensuite décollées de manière douce (non enzymatique) par incubation avec une solution de PBS EDTA (1 à 2 ml/puits) (37°C CO<sub>2</sub> 5% H<sub>2</sub>O 95% pendant 10 min) puis dissociées mécaniquement. Un tel traitement permet de préserver les cellules adhérentes et notamment  
10 les cellules apoptotiques. Les puits sont rincés au PBS afin de récupérer les dernières cellules au fond de ceux-ci. 2 lavages en PBS sont réalisés.

Les cellules sont fixées à l'éthanol 70% ce qui génère la formation de pores dans la membrane cellulaire  
15 et induit sa perméabilisation. A cet effet, 2 ml/puits d'éthanol 70% (congelé) sont rajoutés. Les cellules sont fixées 1 heure à -20°C. Après une centrifugation pour éliminer l'alcool, un lavage en PBS est réalisé.

Les cellules ainsi perméabilisées sont traitées  
20 afin d'extraire les fragments d'ADN générés par l'apoptose. Le tampon d'extraction est préparé extemporanément :

9 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05M  
1 ml acide citrique 25 mM  
25 0,1 % Triton X-100.

Le culot cellulaire obtenu à l'étape suivante est repris par 2 ml de ce tampon, et incubé 1 heure à +4°C.

Après une centrifugation pour éliminer le tampon, un lavage en PBS est réalisé.

30 Eventuellement, afin de visualiser l'aspect des cellules et leurs caractéristiques astrocytaires, un marquage anti-GFAP peut être réalisé. Dans ce cas, le culot cellulaire est repris par 50 µl de BSA à 5% + 50 µl de saponine à 1% en PBS + 20 µl d'anticorps anti-GFAP  
35 (préparé chez le lapin) dilué au 1/100e puis incubé 30 min à température ambiante à l'obscurité. Après 2 lavages en



PBS le contremarquage est réalisé (addition de 50  $\mu$ l de BSA à 5% + 50  $\mu$ l de saponine à 1% en PBS + 20  $\mu$ l d'anti-IgG de lapin marqué à la fluorescéine (FITC) dilué au 1/10e), incubation 15 min à température ambiante à l'obscurité. 2 lavages en PBS sont réalisés.

Après l'éventuel marquage GFAP les suspensions peuvent être conservées 1 à 2 jours en PBS.

Un marquage à l'iodure de propidium (IP), un marqueur de l'ADN, est réalisé par addition sur le culot cellulaire (dans l'ordre) de 100  $\mu$ l de RNase (soit 50 UI) et 250  $\mu$ l d'IP à 50  $\mu$ g/ml.

On effectue la lecture au cytomètre dans les 15 min.

Le marquage à l'IP, éventuellement associé à un marquage GFAP, est utilisé pour identifier et localiser les astrocytes. L'analyse de chaque échantillon est réalisée sur 3000 cellules (cf figures 1A, 1B, 1C et 2A, 2B, 2C).

Par cette méthode les noyaux marqués à l'IP des cellules vivantes sont visualisés sous forme de 3 pics de fluorescence représentant respectivement les phases G0/G1, S et G2/M du cycle cellulaire, comme montré sur la figure 1G. Au contraire, les noyaux marqués à l'IP des cellules apoptotiques, dont l'ADN fragmenté a été extrait au préalable, sont visualisés sous forme d'un pic unique relativement diffus positionné en sub-G1, comme montré sur la figure 2G. Pour démontrer que le pic sub-diploïde (sub-G1) est uniquement dû aux cellules apoptotiques, et pour éliminer des éléments interférents (cellules nécrotiques et débris), les cellules sont tout d'abord analysées dans des conditions expérimentales permettant d'induire une mort par nécrose (Wyllie et al., J. Pathol., 1984, 142, 67-77) (cf figures 1D, 1E et 2D, 2E). Ceci permet d'ajuster les réglages du cytomètre de façon à s'affranchir des cellules non apoptotiques. Les cellules apoptotiques sont alors analysées comme décrit

précédemment (cf figures 1F et 2F sur lesquelles on observe les cellules mortes par apoptose).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau I présenté en fin de description.

5

Exemple 2 : Etape de détermination de cytotoxicité sur la lignée d'astrocytes immortalisés, constituant notamment l'étape de détection de la viabilité cellulaire

10 Comme indiqué dans la description, on peut avantageusement pratiquer une étape de détection de la viabilité cellulaire, avant l'étape de détection par cytométrie de flux. Jusqu'au cinquième jour, le protocole expérimental décrit dans l'exemple 1 est répété.

15 Cinquième jour :

La quantité de cellules vivantes restant dans les puits est évaluée par incorporation de MTT (bromure de tétrazolium) puis lyse à l'isopropanol acide pour mettre en évidence les cristaux de formazan obtenus après  
20 incorporation de MTT dans les cellules vivantes.

On prépare une solution de MTT à 0,5 mg/ml en DMEM/F12 par dilution du MTT (congelé) au 1/10ème dans le DMEM/F12.

Les boîtes sont sorties de l'étuve. Le film  
25 protecteur est ôté. Le milieu est aspiré en prenant soin de ne pas aspirer les cellules adhérentes au fond des puits. On additionne 250 µl/puits de la solution de MTT (en DMEM/F12). On laisse incubé 3 heures au moins à l'étuve (37°C).

30 On prépare l'isopropanol acide (addition de 40 µl/ml d'HCl 1N dans l'isopropanol pur) en prévoyant 100 µl/puits pour les plaques 48 puits.

A titre d'exemple, pour 4 plaques 48 puits, il faut 48 x 4 x 100, soit environ 20 ml d'isopropanol acide.

35 On prépare 30 ml d'isopropanol + 1,2 ml HCl 1N.

On sort les plaques de l'étuve, on aspire la

solution de MTT puis on ajoute 100 µl/puits d'isopropanol acide.

Si la coloration est trop foncée, on rajoute 50 µl/puits d'isopropanol acide.

5 La solution ainsi obtenue dans chaque puits est transférée dans une plaque 96 puits pour pouvoir être lue sur le lecteur de microplaques. On reprend 70 µl/puits d'une plaque 48 puits pour transférer dans une plaque 96 puits.

10 Les DO sont lues à 570 nm (ref 630 nm).

Les valeurs obtenues sont interprétées sur un logiciel approprié, afin d'obtenir un % de gliotoxycité :

Pour chaque boîte, sur l'ensemble des puits contenant les cellules ayant poussé normalement (100% viabilité) on calcule la moyenne et l'écart type des DO lues, le "cut off" est obtenu par différence :

cut off = moyenne - 2x écart-type (= CO).

Chaque échantillon testé est représenté par 3 DO (correspondant aux 3 puits dans lesquels 10 ou 20 µl d'échantillon ont été ajoutés), on calcule la moyenne des 3 DO (= DOc) ; ainsi pour chaque échantillon on obtient une différence de DO (DO) et un pourcentage de toxicité (% tox) :

$DO = CO - DOc$

25  $\% \text{ tox} = (1 - (DOc / CO)) \times 100$

Si pour un échantillon les 3 puits donnent 3 DO différentes, l'échantillon est retesté.

Exemple 3 : Techniques d'enrichissement de l'échantillon biologique, en facteur gliotoxique, pour obtenir une fraction, soumise à l'étape selon l'Exemple 1, et, éventuellement l'étape de détermination selon l'Exemple 2

3.1) Précipitation de la fraction protéique

35 On utilise une solution à 60 % en poids de sulfate d'ammonium dans l'eau.

### 3.2) Chromatographie par exclusion

On utilise une colonne TSK G 2000 (commercialisée par SUPELCO), en phase liquide haute pression, avec un tampon de pH à 6,8, avec un phosphate à 0,1 M, et du sulfate de sodium à 0,1 M.

Le temps d'acquisition est de 60 minutes, et l'échantillon injecté est de 1 ml.

### 3.3) Chromatographie par échange ionique

On utilise une colonne DEAE-Sepharose (DEAE: diéthylaminoéthyl) (commercialisée par PHARMACIA), en phase liquide haute pression, à débit rapide, avec un tampon Tris 20 mM, à un pH de 7,5, avec une élution par étapes avec une solution de NaCl de 100 mM à 1 M, la fraction utile étant à 200 mM.

### 3.4) Electrophorèse à une ou deux dimensions

On utilise la technique SDS PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), avec un gel à 17 % d'acrylamide. On transfère l'électrogramme sur membrane Porablot (nom commercial), et on procède à une coloration avec un colorant noir-amide.

Exemple 4 : Equivalence biologique de l'urine et du LCR d'un patient atteint de la sclérose en plaques, pour la détermination du facteur gliotoxique.

4.1) Des échantillons de LCR d'une part, et d'urine d'autre part, de patients souffrant de la sclérose en plaques (SEP), sont soumis à volume égal à un même prétraitement de séparation de la fraction protéique, selon l'exemple 3.1, laquelle est ensuite soumise et à une chromatographie par exclusion selon l'exemple 3.2, et à une chromatographie par échange ionique selon l'exemple 3.3.

Pour chaque type de chromatographie, l'urine et le LCR sont résolus de la même manière, et laissent apparaître une fraction, située entre 15 kD et 20 kD en ce qui concerne la chromatographie par exclusion, et éluee

par 200 mM de NaCl en ce qui concerne la chromatographie par échange d'ion.

Cette fraction est testée selon l'étape décrit à l'exemple 2, et démontre une activité gliotoxique.

5 4.2) Des échantillons de LCR d'une part, et d'urine d'autre part, de patients SEP, sont soumis à une électrophorèse à une dimension, selon l'exemple 3.4. Dans les deux cas, on observe un seuil de coupure situé entre 15 et 25 kD, correspondant à une activité cytotoxique.

10 4.3) Des échantillons d'urine de patients SEP, et de patients sains, et de patients atteints d'autres maladies neurologiques, sont soumis à l'étape selon l'exemple 2.

15 Les résultats rassemblés selon le tableau II (figurant en fin de description) montrent une relative spécificité de l'urine en tant qu'échantillon biologique pour la détermination du facteur gliotoxique.

Exemple 5 : Détermination par voie urinaire du  
20 facteur gliotoxique dans une population importante, par détection de cytotoxicité .

Les échantillons urinaires sont testés selon le protocole identifié dans l'exemple 2.

25 En ce qui concerne les patients atteints de sclérose en plaques, il s'agit de patients hospitalisés dans un service de neurologie (-90 % pour un flash corticoïde au moment d'une poussée), ou dans un service de rééducation spécialisé (patients généralement hors poussées, -50 % en phase chronique de la maladie). En ce  
30 qui concerne les patients atteints d'autres maladies, il s'agit de patients hospitalisés dans un service de neurologie (sans restriction de pathologie, d'âge ou de sexe). Les résultats obtenus sur 108 urines de patients atteints de sclérose en plaques (classés selon les  
35 critères de Poser certaines ou probables, C.M. Poser et al., New diagnostic criteria for multiple sclerosis :

guidelines for research protocols, dans "The Diagnosis of Multiple Sclerosis", C.M. Poser, D.W. Paty, L. Scheinberg, W.I. Mac Donald, G.C. Ebers, pp 225-229, 1984, Thieme Stratton Inc., New-York), 116 urines de patients atteints  
5 d'autres maladies neurologiques et 29 urines de témoins sains sont présentés dans le Tableau III (figurant en fin de description).

Les résultats obtenus mettent en évidence une positivité du test chez 98 patients atteints de sclérose  
10 en plaques et un test négatif chez 10 patients atteints de sclérose en plaques. Mais cependant, ce test génère 40 faux-positifs dans les patients atteints d'autres maladies neurologiques et 2 faux-positifs dans les contrôles sains.

Le test défini dans l'exemple 2 n'est donc pas  
15 totalement spécifique à lui seul.

Exemple 6 : Détermination de l'état des cellules par cytométrie

La méthode selon l'Exemple 1 permet à la fois de  
20 juger de l'état des astrocytes et de détecter la mort cellulaire (notamment différenciation entre nécrose et apoptose), et la ploïdie.

Cette méthode est basée sur la détection par cytométrie de flux (CMF) i) de la morphologie cellulaire  
25 (le FALS ("Forward Light Angle Scatter") permet la visualisation de la taille des cellules, le SS ("Side Scatter") permet la visualisation de leur structure), ii) des caractéristiques astrocytaires (marquage anti-GFAP ("Glial Fibrillary Acidic Protein"), révélation anti-Ig-FITC), iii) de la ploïdie (marquage à l'iodure de  
30 propidium (IP) après fixation à l'éthanol 70 % et extraction des éventuels fragments d'ADN) et par suite du cycle cellulaire. Cette dernière étape (utilisant l'IP) permet de différencier les débris cellulaires, les  
35 cellules nécrotiques, les cellules apoptotiques et les cellules diploïdes capables de se diviser normalement.

On a alors testé 30 faux-positifs obtenus selon l'Exemple 5, et fait la constatation que les urines non-SEP produisaient des effets de nécrose et/ou inhibition de prolifération, à l'exclusion de phénomènes apoptotiques, 5 alors que les urines SEP conduisaient au moins à une apoptose.

Exemple 7 : Association des méthodes selon les exemples 1 et 2

10 L'association des deux tests a alors été évaluée sur 30 urines de sclérose en plaques et 30 urines de témoins neurologiques (non-SEP) après l'étape de détection de la viabilité cellulaire. L'étude a conduit à l'obtention du tableau IV, figurant à la fin de la 15 description. Ainsi les résultats obtenus montrent une bonne sensibilité et une bonne spécificité.

Tableau I : Résultats obtenus par le procédé de l'invention tel que décrit dans l'exemple 1, par cytométrie de flux après extraction des fragments d'ADN et coloration de l'ADN à l'iodure de propidium

5

10

	SEP certaines	Autres maladies neurologiques	Témoins sains
nb de patients testés	35	36	15
Apoptose	32 soit 91%	5 soit 14%	0 soit 0%
Absence d'apoptose	3 soit 9%	31 soit 89%	15 soit 100%

15

Tableau II : Test de gliotoxycité sur culture astrocytaire à partir d'urines (cf exemple 4)

25

Test MTT	SEP (n=30)	AMN* (n=32)	contrôles sains (n=19)
positif	n=28	n=5	n=1
négatif	n=2	n=27	n=18

30

AMN : autres maladies neurologiques, non-SEP



Tableau III: Test de gliotoxicité sur culture astrocytaire à partir d'urines (cf exemple 5)

Test MTT	SEP (n=108)	AMN* (n=116)	contrôles sains (n=29)
positif	n=98 91%	n=40 34%	n=2 7%
négatif	n=10 9%	n=76 66%	n=27 93%

AMN : autres maladies neurologiques, non-SEP

Tableau IV: Test de gliotoxicité sur culture astrocytaire à partir d'urines (cf Exemple 7)

Test par CMF**	SEP (n=30)	AMN* (n=30)
nécrose ou inhibition de prolifération	n=1 3%	n=30 100%
apoptose	n=29 97%	n=0 0%

AMN : autres maladies neurologiques, non-SEP

CMF : cytométrie de flux

COPIE DE CONFIRMATION

## REVENDEICATIONS

1) Procédé pour détecter et/ou quantifier, dans un échantillon biologique, un facteur gliotoxique, selon  
5 lequel on dispose d'une fraction de départ dudit échantillon, éventuellement enrichie en ledit facteur gliotoxique par un traitement préalable, on incube ladite fraction de départ avec un milieu de culture de référence comprenant des cellules macrogliales, par exemple  
10 immortalisées, telles que des cellules astrocytaires, et on détecte et/ou quantifie les cellules macrogliales mortes et/ou vivantes, **caractérisé en ce que l'échantillon biologique est un échantillon d'urine.**

2) Procédé pour détecter et/ou quantifier, dans  
15 un échantillon biologique, un facteur cytotoxique vis-à-vis de cellules adhérentes cibles et dont la cytotoxicité induit la mort par apoptose desdites cellules, selon lequel on dispose d'une fraction de départ dudit échantillon, éventuellement enrichie en ledit facteur  
20 toxique par un traitement préalable, on incube ladite fraction de départ avec un milieu de culture de référence comprenant des cellules adhérentes cibles, et on détecte et/ou quantifie les cellules adhérentes mortes par apoptose, **caractérisé en ce que, aux fins de la détection**  
25 **et/ou quantification des cellules adhérentes mortes par apoptose, on détecte, par cytométrie de flux, au moins une caractéristique directe ou indirecte, associée aux cellules adhérentes apoptotiques de tout ou partie du milieu incubé, qui, si elle existe et/ou est quantifiée,**  
30 **qualifie ledit échantillon biologique comme positif, c'est-à-dire contenant ledit facteur toxique.**

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le facteur toxique est le facteur gliotoxique et en ce que les cellules adhérentes cibles sont les cellules  
35 macrogliales, notamment des cellules astrocytaires.

4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé

COPIE DE CONFIRMATION

en ce que, aux fins de la détection et/ou quantification des cellules macrogliales mortes par apoptose spécifiquement, par cytométrie de flux, le procédé comprend les étapes suivantes :

- 5                   - le décollement des cellules macrogliales adhérentes,
- le traitement des cellules ainsi décollées par un agent de fixation cellulaire et de perméabilisation de la membrane cytoplasmique desdites cellules,
- 10                  - l'extraction de fragments d'ADN intracellulaire résultant de l'apoptose,
- le marquage de l'ADN cellulaire restant, par un marqueur approprié, et
- la détection par cytométrie de flux de la
- 15 ploïdie des cellules macrogliales.

5) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'agent de fixation cellulaire et de perméabilisation de la membrane cytoplasmique des cellules est l'éthanol.

- 20                  6) Procédé selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce que le marqueur de l'ADN est l'iodure de propidium (IP).

7) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que, aux fins de la détection et/ou quantification

25 des cellules macrogliales mortes par apoptose spécifiquement, par cytométrie de flux, le procédé comprend les étapes suivantes :

- l'induction d'une nécrose sur un échantillon de cellules macrogliales vivantes, différent de l'échantillon
- 30 à analyser,
- le marquage des débris d'ADN résultant de la nécrose, lesdits débris étant associés à des fragments de la membrane cytoplasmique des cellules macrogliales nécrotiques, le marquage étant effectué après décollement
- 35 des cellules,
- la localisation en cytométrie de flux, des

cellules mortes par nécrose, et réglage approprié du cytomètre permettant lors de l'étape de détection des cellules mortes par apoptose, d'exclure les cellules mortes par nécrose,

- 5           - la détection dans l'échantillon à analyser des cellules mortes par apoptose.

8) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que, aux fins de la détection et/ou quantification des cellules macrogliales mortes par apoptose  
10 spécifiquement, par cytométrie de flux, ledit procédé comprend les étapes suivantes :

- le partage des cellules de l'échantillon biologique en deux parties égales, et le décollement des cellules,  
15           - la détection, par cytométrie de flux, dans une des deux parties, des cellules macrogliales mortes par apoptose ou par nécrose, d'une part, et/ou des cellules macrogliales vivantes, d'autre part, étape selon laquelle on traite ladite fraction avec un agent de fixation  
20 cellulaire et de perméabilisation de la membrane cytoplasmique ; on extrait les fragments d'ADN ; on marque à l'aide d'un marqueur de l'ADN intracellulaire restant, et on détecte ce dernier,

- la détection, par cytométrie de flux après  
25 fixation sans extraction, dans l'autre des deux parties, des cellules macrogliales vivantes et des cellules macrogliales apoptotiques, d'une part, et/ou des cellules macrogliales nécrotiques, d'autre part,

- la déduction des détections effectuées sur  
30 chacune des deux parties, de la quantité de cellules macrogliales apoptotiques.

9) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend, avant l'étape de détection et/ou quantification des  
35 cellules macrogliales apoptotiques, une étape de détection de la viabilité cellulaire, selon laquelle on inocule la

fraction de départ dans le milieu de culture de référence, puis on observe le taux de prolifération des cellules macrogliales par rapport à une valeur de référence, en deçà de laquelle ladite fraction dite positive est retenue  
5 pour être soumise ensuite à l'étape de détection de l'apoptose des cellules macrogliales spécifiquement, pour qualifier ou non l'échantillon biologique comme vrai positif.

10 10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que pendant l'étape de détection de la viabilité cellulaire le taux de prolifération des cellules macrogliales est obtenu par coloration mitochondriale des cellules macrogliales du milieu de culture, par exemple par du bromure de méthyltétrazolium, puis par mesure de la  
15 densité optique du milieu de culture coloré.

20 11) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 10, caractérisé en ce qu'on pratique en outre, pendant l'étape de détection de l'apoptose des cellules macrogliales spécifiquement, une détermination de la présence et/ou quantité d'une protéine permettant de discriminer les sous-populations cellulaires, telle que la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), par exemple avec un anticorps anti-GFAP identifiable directement ou indirectement.

25 12) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fraction de départ est obtenue par enrichissement ou purification de l'échantillon biologique en facteur gliotoxique, selon au moins l'un des traitements suivants,  
30 à savoir précipitation de la fraction protéique, par exemple avec du sulfate d'ammonium, chromatographie par exclusion et/ou ionique, électrophorèse à une ou deux dimensions, mise en contact avec la protéine A ou une lectine, par exemple la concanavoline-A.

35 13) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 12, caractérisé en ce que l'échantillon

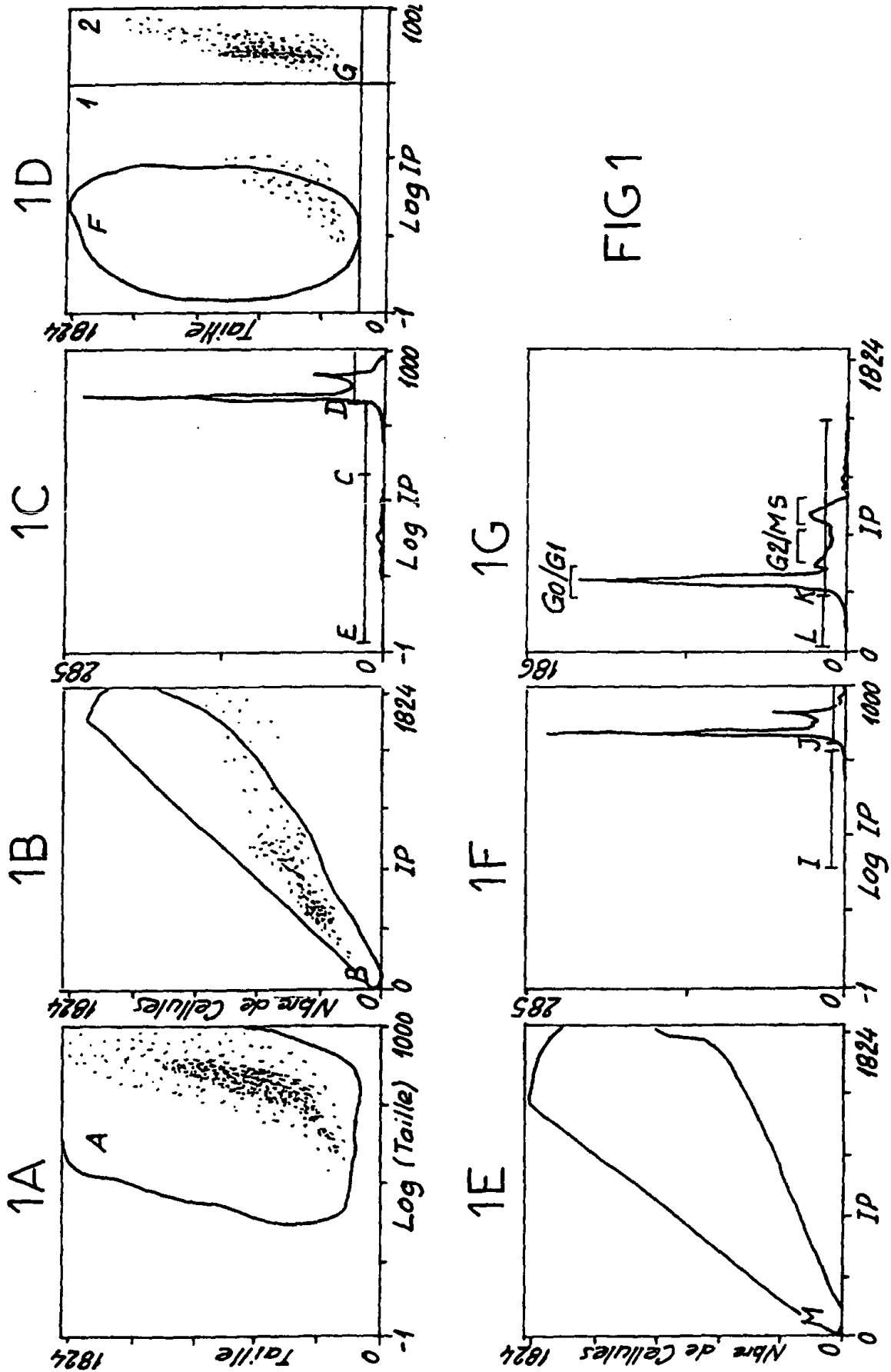
biologique est un échantillon d'urine.

14) Utilisation d'un échantillon d'urine pour détecter, dans un échantillon biologique, un facteur gliotoxique tel qu'associé à la sclérose en plaques.

5 15) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le milieu de culture de référence comprend une lignée cellulaire immortalisée de cellules macrogliales, par exemple une lignée cellulaire immortalisée d'astrocytes.

10

COPIE DE CONFIRMATION



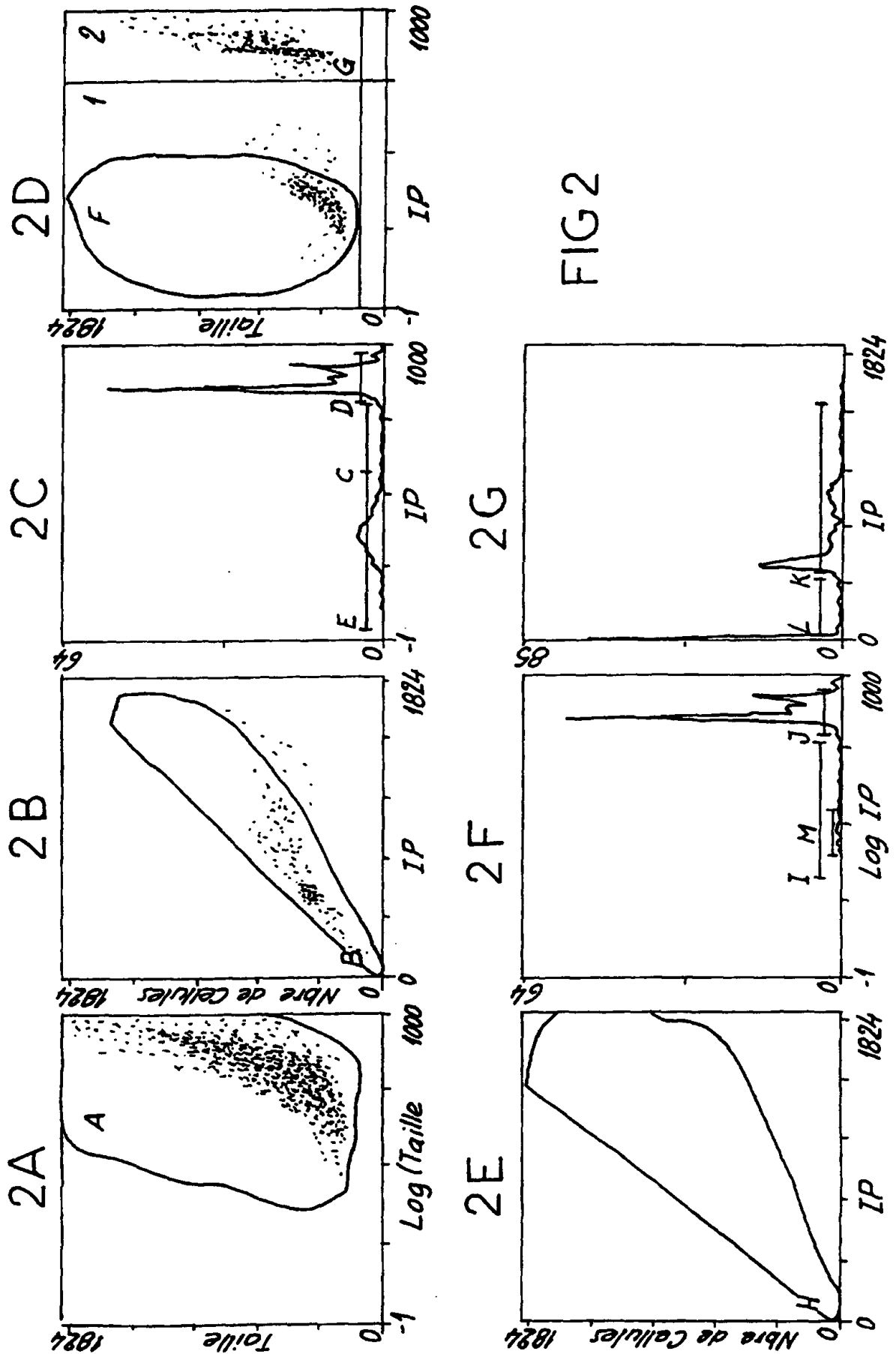


FIG 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 97/01620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 G01N33/564 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	EP 0 667 354 A (BIO MERIEUX) 16 August 1995 see abstract see page 4, column 29 - page 5, column 38; examples 5,8 & WO 95 21859 A cited in the application ---	2,3,8, 12,15 6,10
Y	EP 0 731 179 A (PETRAROLI SALVATORE) 11 September 1996 cited in the application see abstract ---	2,3,8, 12,15
	---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 December 1997

Date of mailing of the international search report

23. 12. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ceder, 0

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 97/01620

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>RIEGER ET AL.: "Un facteur gliotoxique et la sclérose en plaques"</p> <p>COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES - SERIE III,</p> <p>vol. 319, no. 4, April 1996, PARIS,</p> <p>pages 343-350, XP000602023</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p>	<p>2,3,</p> <p>8-12,15</p>
A	<p>GIULIAN ET AL.: "Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1"</p> <p>SCIENCE,</p> <p>vol. 250, 14 December 1990,</p> <p>pages 1593-1596, XP000673668</p> <p>see page 1593, right-hand column</p> <p>---</p>	<p>2,3,8</p>
A	<p>AMOURI ET AL.: "A new gliotoxic activity and its implications for the immunopathogenesis of multiple sclerosis"</p> <p>NEUROPSYCHIATRIE,</p> <p>vol. 9, no. 2, 1995, MÜNCHEN-DEISENHAFEN,</p> <p>page 94 XP000197520</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p>	<p>2</p>
A	<p>WARING ET AL.: "Extracellular calcium is not required for gliotoxin or dexamethasone-induced DNA fragmentation: a reappraisal of the use of EGTA."</p> <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPHARMACOLOGY,</p> <p>vol. 17, no. 5, May 1995, OXFORD,</p> <p>pages 403-410, XP000197519</p> <p>-----</p>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01620

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0667354 A	16-08-95	FR 2716198 A	18-08-95
		AU 1815295 A	29-08-95
		CA 2142557 A	16-08-95
		FI 954876 A	13-10-95
		WO 9521859 A	17-08-95
		JP 8511808 T	10-12-96
		NO 954081 A	13-12-95
-----			
EP 0731179 A	11-09-96	IT RM950142 A	09-09-96
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. e internationale No  
PCT/FR 97/01620

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6 G01N33/564 G01N33/50		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 G01N C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y  A     Y	EP 0 667 354 A (BIO MERIEUX) 16 août 1995  voir abrégé voir page 4, colonne 29 - page 5, colonne 38; exemples 5,8 & WO 95 21859 A cité dans la demande --- EP 0 731 179 A (PETRAROLI SALVATORE) 11 septembre 1996 cité dans la demande voir abrégé --- <div style="text-align: center;">-/-</div>	2,3,8, 12,15 6,10       2,3,8, 12,15
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">10 décembre 1997</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">23. 12. 97</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Ceder, 0</div>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 97/01620

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>RIEGER ET AL.: "Un facteur gliotoxique et la sclérose en plaques"</p> <p>COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES - SERIE III,</p> <p>vol. 319, no. 4, avril 1996, PARIS,</p> <p>pages 343-350, XP000602023</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	<p>2,3,</p> <p>8-12,15</p>
A	<p>GIULIAN ET AL.: "Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1"</p> <p>SCIENCE,</p> <p>vol. 250, 14 décembre 1990,</p> <p>pages 1593-1596, XP000673668</p> <p>voir page 1593, colonne de droite</p> <p>---</p>	<p>2,3,8</p>
A	<p>AMOURI ET AL.: "A new gliotoxic activity and its implications for the immunopathogenesis of multiple sclerosis"</p> <p>NEUROPSYCHIATRIE,</p> <p>vol. 9, no. 2, 1995, MÜNCHEN-DEISENHAFEN,</p> <p>page 94 XP000197520</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	<p>2</p>
A	<p>WARING ET AL.: "Extracellular calcium is not required for gliotoxin or dexamethasone-induced DNA fragmentation: a reappraisal of the use of EGTA."</p> <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPHARMACOLOGY,</p> <p>vol. 17, no. 5, mai 1995, OXFORD,</p> <p>pages 403-410, XP000197519</p> <p>-----</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. e Internationale No

PCT/FR 97/01620

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0667354 A	16-08-95	FR 2716198 A	18-08-95
		AU 1815295 A	29-08-95
		CA 2142557 A	16-08-95
		FI 954876 A	13-10-95
		WO 9521859 A	17-08-95
		JP 8511808 T	10-12-96
		NO 954081 A	13-12-95
-----			
EP 0731179 A	11-09-96	IT RM950142 A	09-09-96
-----			

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)